

脱感作機構に関する実験的研究 (VI)

組織培養による Tuberculin 脱感作の研究

第2篇 組織培養発育抑制現象と感染菌毒力の関係及び Tuberculin 反応, 沈降反応発現の時期的関係について

相 沢 芙 東

札幌医科大学病理学教室 (指導 新保教授・小野江教授)

Experimental Studies on the Mechanism of Desensitization (VI)

Studies on the Tuberculin Desensitization by Tissue Culture

II. Relation between Tissue Culture Inhibition and Virulency of Bacilli, Tuberculin or Precipitation Reaction

By

FUTABA AIZAWA

*Department of Pathology, Sapporo Medical College
(Directed by Prof. K. SHIMPO & Prof. T. ONOE)*

The present paper deals with relations of inhibition of the cultivated leukocytes by tuberculin to the virulence of tubercle bacilli employed for sensitizing animals, sensitivity of tuberculin skin reaction and intensity of precipitation reaction of serum.

Each group of rabbits was inoculated with 1) 10 mg. of non-virulent BCG and 2) 1/100 mg. of virulent tubercle bacilli of the Nakano strain.

Blood leukocytes were obtained from these rabbits every ten days after the inoculation, and cultivated routinely. At the same time, tuberculin skin reaction and serum precipitation reactions were also tested in each of the animals.

The results are follows:

1) The inhibition of the culture by the addition of tuberculin began to appear 42 to 54 days after the inoculation of virulent bacilli, however, when non-virulent bacilli were used for the inoculum, almost no inhibition of the culture was observed. In other words, the more virulent the bacilli for inoculation, the earlier and the more intensive the inhibition.

2) Tuberculin skin reaction turned positive on the 14th to the 20th day after the inoculation and serum precipitation reaction began to become positive on the 7th to 24th day after the inoculation in each group.

3) The inhibition of the culture was observed to appear delayed as compared with the appearance of positive tuberculin skin reaction and positive serum precipitation reaction.

緒 論

第1篇において結核感染家兎白血球ツ添加組織培養では、遊走増殖抑制現象が認められ、且つ面積測定法によりある程度の定量的観察が可能なことを知ることが出来た。このツの発育抑制に対する特異性については多くの研究者により報告されているので、本篇では結核感染時の結核菌毒力の強弱と本現象出現の関係及びその時期について検討し、またツ反応、血清抗体と本現象との時期的な関係についても追求した。

本現象と結核菌毒力の強弱の関係について追求した研究は甚だ少ない。僅かに Waksman¹⁾ がツ反応の強度と本現象の関係を論じているに過ぎない。著者は弱毒菌感染群 (BCG 感染) 及び強毒菌感染群 (人型・野村株感染) について経時的に組織培養を行い、発育抑制現象の出現を観察したが、後者では本現象が著明に認められるに反し、前者では軽度ないし不定であり、後に強毒株重感染を行つて本現象を確実に認めることが出来た。

結核感染に特異的である以上、他の血清免疫抗体との関

係が問題になつて来る訳であるが、この点についても殆ど報告されていないが、Heilman²⁾等が死菌感作時における組織培養発育抑制現象と沈降反応、ツ反応の関係を追求している成績が注目される。

結核感染時の免疫抗体については、多く補体結合反応によつて抗体を追求しているが、いずれも各個体のアレルギーの程度と補体結合抗体との間には関連が認められないとされている^{3)~6)}。安在⁷⁾は Sauton-tuberculin を抗原として沈降抗体を追求し、これが個体のアレルギーと密に関係し、結核感染時及び脱感作時において Albumin 感作及び脱感作と同様の沈降抗体の消長を示すことを証明している。

著者は組織培養と併行して Sauton-tuberculin を抗原とする沈降反応を行い、ツ反応とともに時期的関係を検討した。

実験材料並びに方法

実験動物： 体重 3 kg 前後の白色成熟家兎 15 羽を使用し、幼弱なものは避けた。

結核菌感染方法： 家兎 5 羽を 1 群として 3 群に分け結核菌感染を行つたが、第 I 群はまず弱力株感染として BCG 10 mg を臀部皮内に 5 個所に分け注射し、感染 35 日後に仲野株 1/100 mg 耳静脈内重感染を行つた。第 II 群及び第 III 群は時期を異にした強力株感染群で前者は仲野株 1/100 mg 耳静脈内注射、後者は仲野株 1 mg* 耳静脈内注射を行つた。

Tuberculin 反応： 標準伝研 OT の生理食塩水 40 倍稀釈液 0.1 cc を使用し、48 時間判定で発赤、腫張、硬結を測定した。

沈降反応： 抗原は OT を使用し重層法により測定値は緒方⁸⁾の抗体価にならない、抗血清の倍数稀釈をとり、同時に抗原稀釈値をも測定し参考とした。

組織培養法： 第 1 篇に記述した被覆硝子法により 37°C 培養、約 40 時間で測定した。

遊走発育度測定： 第 1 篇に記述した面積測定を行い Moen & Swift¹¹⁾ にならい遊走発育度 (R.M.)、細胞毒係数 (C.I.)、比較細胞毒係数 (C.C.I.) を算出した。

実験成績

Tuberculin 反応及び沈降反応： 結核菌感染家兎 3 群の Tuberculin 反応及び沈降抗体価は Table 1 に示した如くである。

第 I 群 BCG 10 mg 感染群ではツ反応は 7 日目で 2 例、12 日目で 2 例、14 日目で全例陽転し、以後発赤径 15 ~ 25 mm にとどまつた。35 日目に仲野株 1/100 mg 耳静脈内重感染を行つたところ、第 1 日目にツ反応は低下し陰性となる例もあつたが間もなく回復し 3 日目には殆ど以前の値と変りなくなつた。沈降反応は感染後 7 日目より全例に出現し、抗体価は 2 倍ないし 4 倍を呈し、以後 8 倍までの価を示した。

第 II 群仲野株 1/100 mg 感染群ではツ反応は 1 例のみ 10 日目に、他は遅れて 20 日目に全例陽転して、以後発赤径 20 mm 前後にとどまつた。沈降反応は感染後 8 日目より 1 例を除き全例に出現し抗体価は 4 倍までの価を有した。

第 III 群ではツ反応は感染後 10 日目で 2 例、17 日目に全例陽転し、また沈降反応は 24 日目頃より出現し最高 16 倍までの抗体価を示した。

Table 1. Relation between the Antibody Titer and Tuberculin Reaction in Rabbits Inoculated with Tubercle Bacilli

Days after infection			7 day	12	14	24	29	36 (1)	38 (3)	58 (23)
Group I	No. 1	Antibody titer	4 × 80	4 × 160	4 × 80	4 × 160	8 × 80	8 × 160	8 × 640	8 × 640
		Tuberculin reaction	0	18 × 23	22 × 25	25 × 23	21 × 23	15 × 14	15 × 14	12 × 15
	No. 2	A.T.	2 × 80	4 × 80	4 × 160	4 × 320	4 × 320	8 × 320	8 × 640	4 × 40
		T.R.	15 × 18	18 × 20	25 × 23	20 × 23	16 × 18	10 × 12	20 × 23	20 × 15
	No. 3	A.T.	4 × 80	4 × 160	8 × 320	4 × 320	4 × 320	4 × 160	4 × 320	4 × 640
		T.R.	10 × 10	18 × 20	22 × 23	20 × 20	13 × 15	0	20 × 16	20 × 17
	No. 4	A.T.	2 × 160	4 × 80	4 × 160	4 × 320	4 × 80	8 × 80	8 × 640	8 × 640
		T.R.	0	0	15 × 14	23 × 22	22 × 23	0	18 × 18	10 × 12
	No. 5	A.T.	4 × 160	4 × 160	2 × 160	4 × 160		8 × 160	8 × 320	
		T.R.	0	20 × 20	20 × 20	20 × 18	10 × 10	?		

* 実験当時菌の毒力が低下していたため、感染量を第 II 群の 100 倍とした。

Days after infection			8 day	10	14	20	25	34	44	54
Group II	No. 6	A.T.	4×160	2×160	4× 40					
		T.R.	0	0	0					
	No. 7	A.T.	2×160	1× 40	4× 80		1× 80	4×160	2×160	4×160
		T.R.	0	0	0	8× 6	10× 10	20× 18	19× 17	20× 18
	No. 8	A.T.	0	0	1× 40		0	2× 80	2×320	2×320
		T.R.	0	0	0	12×13	17× 16	20× 20	18×16	23× 25
	No. 9	A.T.	0	1× 40	0		0	0	4×160	2× 80
		T.R.	0	10× 9	10× 9	13×14	9× 10	14× 12	20× 20	15× 20
	No. 10	A.T.	1×160	2×160	2× 80		2×160	2× 80	4×160	4×160
		T.R.	0	0	0	7× 8	10× 10	$\frac{10 \times 10}{24 \times 25}$	16× 20	20× 19
Days after infection			10 day	17	24	32	49			
Group III	No. 11	A.T.	0	0	4×160	16×320	8×320			
		T.R.	0	17×15	15× 13		20× 22			
	No. 12	A.T.	0	0	4×160					
		T.R.	0	20×15	0					
	No. 13	A.T.	0	0	4×320	16×320	8×640			
		T.R.	0	10×11	20× 18		20× 20			
	No. 14	A.T.	0	0	2× 80	16×320	16×320			
		T.R.	4×4(±)	15×13	20× 18		15× 16			
	No. 15	A.T.	0	0	4×320	16×160	16×320			
		T.R.	9×8	25×23	20× 23		20× 22			

組織培養： 前述の感染家兎に対しツ反応及び沈降反応とともに組織培養を行い Fig. 1, 2 及び Fig. 3 に示す如き結果を得た。図について簡単に説明を加えれば、

- 組織培養発育抑制現象陽性 (C.I. 0.5 以下)
- 組織培養発育抑制現象陰性 (C.I. 0.8 以上)

即ち第1篇で正常家兎白血球組織培養においても、高濃度 OT (120 倍まで) 添加では軽度に発育抑制を認め、この時の平均 C.I. 0.8 であるので、高濃度 OT 添加時 C.I. 0.8 以上は発育抑制現象陰性とみなした。

- C.I. 0.6 以上 0.8 まで
- C.I. 0.5 以上 0.6 まで

また円の上半部は高濃度 OT 添加例を下半分は低濃度 OT 添加例を示している。

第I群では感染6日目に1時的に No. 1, 3 の高濃度 OT 添加例に抑制が認められたが、以後14日まで発育抑制は認められず、24日頃より次第に抑制があらわれ、58日では2羽は確実に1羽は、ほぼ確実に抑制があらわれた。

第II群では感染12日目に1時的に No. 9 高濃度 OT 添加例に抑制が認められたが、他は抑制は認められず、24日

頃より次第に抑制があらわれ、34日では3羽は確実に1羽はは大略確実に発育抑制があらわれ、54日では全例陽性となった。

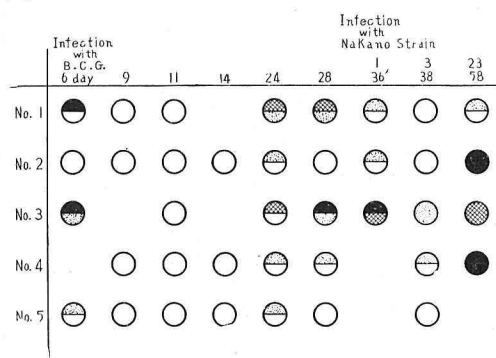


Fig. 1. Relation between tissue culture inhibition and days after infection (Group I.)

- Note: ○ Tissue culture inhibition (-)
- C.I. 0.6~0.8
 - C.I. 0.5~0.6
 - Tissue culture inhibition (###) (Under C.I. 0.5)

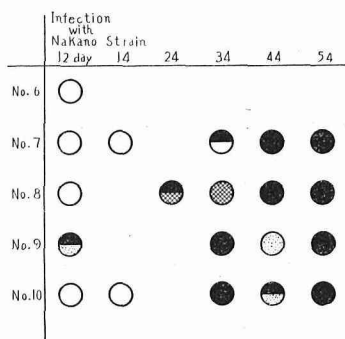


Fig. 2. Relation between tissue culture inhibition and days after infection (Group II)

第III群では21日でNo. 12の発育抑制陽性となつたが死亡した。他の4羽は42日に3羽、49日に4羽共全部、発育抑制現象は確実に出現した。

この実験結果からBCG感染より仲野株感染群においてより確実に発育抑制の出現することが判明したが、第I群58日目、第II群54日目の各係数(R.M., C.I., C.C.I.)を示すとTable 2及びTable 3のようになる。仲野株感染では54日目で全例共にC.I. 0.37以下で、各例について記すとNo. 7は0.26以下、No. 8は0.37以下、No. 9は0.24以下、No. 10は0.17以下で、いずれも著明な発育抑制を認めるに反して、BCG感染58日目では、No. 2及びNo. 4の60倍OT添加例以上では抑制を認めC.I. 0.46以下であるが一般に第II群に比して組織培養発育抑制現象が不確

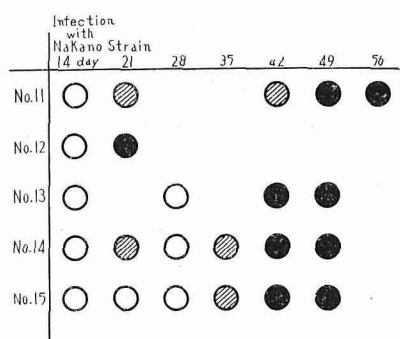


Fig. 3. Relation between tissue culture inhibition and days after infection (Group III)

Note: ○ Tissue culture inhibition
⊙ T. C. I. : Uncertainty
● Tissue culture inhibition (##)

実ないし弱かつた。

総括考按

以上の成績を総括すると、結核感染家兎の白血球培養の抑制現象は結核菌毒力については弱株感染より強株感染に早期に確実に出現すること及びツ反応陽転後、沈降抗体出現後に出現することが判明した。実験例の全例をとおしてみるとツ反応は感染20日までに陽転し、沈降抗体は24日頃までに出現するが、組織培養発育抑制現象は強毒株感染例で49日ないし54日で全例確実となるが、弱毒株感

Table 2. Effects of Tuberculin upon the Growth and Migration of Cultivated Leukocyte from Tuberculous and Normal Rabbits

Dilut. of tuberculin	No. 1			No. 2			No. 3			No. 4			Normal		
	Average R.M.	C.I.	C.C.I.	Average R.M.	C.I.	C.C.I.	Average R.M.	C.I.	C.C.I.	Average R.M.	C.I.	C.C.I.	Average R.M.	C.I.	C.C.I.
30×	1.40	0.68	0.68	0.45	0.36	0.36	0.24	0.36	0.36	1.03	0.74	0.74	3.05	1.05	1.0
60×	0.80	0.38	0.38	0.44	0.31	0.31	0.40	0.59	0.59	0.62	0.44	0.44	3.05	1.05	1.0
90×	2.50	1.24	1.20	0.54	0.44	0.44	0.36	0.54	0.53	0.49	0.35	0.35	3.00	1.03	1.0
120×	0.80	0.38	0.45	0.48	0.39	0.46	0.50	0.75	0.89	0.27	0.19	0.22	2.46	0.85	1.0
240×	1.50	0.71	0.75	0.60	0.48	0.50	0.50	0.75	0.80				2.75	0.95	1.0
300×				0.39	0.32	0.35	0.33	0.49	0.53	0.30	0.27	0.29	2.70	0.93	1.0
600×	1.94	0.92	0.65	0.38	0.31	0.22	0.23	0.34	0.24	0.15	0.14	0.10	4.25	1.40	1.0
Control	2.10	1.00	1.0	1.23	1.0	1.0	0.67	1.0	1.0	1.40	1.0	1.0	2.90	1.0	1.0
Tuberculin reaction	12×15			20×15			20×17			10×12			0		
Antibody titer	8×640			4×40			4×640			8×640			0		

Note: Tuberculous rabbits after 58 days inoculated with B.C.G. (Group I)

Table 3. *Effects of Tuberculin upon the Growth and Migration of Cultivated Leukocyte from Tuberculous and Normal Rabbits*

Dilut. of tuberculin	No. 7			No. 8			No. 9			No. 10			Normal		
	Ave- rage R.M.	C.I.	C.C.I.	Ave- rage R.M.	C.I.	C.C.I.	Ave- rage R.M.	C.I.	C.C.I.	Ave- rage R.M.	C.I.	C.C.I.	Ave- rage R.M.	C.I.	C.C.I.
30×	0.23	0.05	0.07	0.60	0.14	0.20	0.23	0.04	0.06	0.36	0.10	0.14	2.77	0.71	1.0
60×	0.48	0.1	0.13	0.40	0.10	0.13	0.69	0.13	0.16	0.43	0.11	0.14	3.12	0.80	1.0
90×	0.68	0.15	0.17	0.61	0.14	0.16	0.47	0.09	0.10	0.33	0.09	0.11	3.36	0.86	1.0
120×	0.65	0.14	0.17	1.00	0.24	0.29	0.97	0.18	0.22	0.39	0.10	0.12	3.24	0.83	1.0
240×				0.72	0.17	0.17	1.11	0.21	0.23	0.38	0.10	0.10	4.0	1.02	1.0
300×	1.03	0.23	0.23	0.95	0.23	0.23	0.73	0.14	0.14	0.64	0.17	0.17	3.91	1.00	1.0
600×	1.17	0.26	0.24	1.52	0.37	0.34	1.28	0.24	0.22	0.25	0.07	0.06	4.26	1.09	1.0
Control	4.6	1.0	1.0	4.17	1.0	1.0	5.37	1.0	1.0	3.75	1.0	1.0	3.91	1.0	1.0
Tuberculin reaction	20×18			23×25			20×20			20×19			0		
Antibody titre	4×160			2×320			4×320			4×160			0		

Note: Tuberculous rabbits after 54 days inoculated with the Nakano Strain of tubercle bacilli (Group II)

染ではさらに遅れるか不確定であつた。

Aronson^{9),10)}, Moen & Swift¹¹⁾ 等の一連の研究によりツによる組織培養発育抑制現象は結核感染と特異的な関係にあることがあきらかとなり、著者もほぼ同様の結果を得たことを第1篇において報告した。

そこで本現象と結核感染の菌毒力の強弱、或いは感染との時期的関係、或いはツ反応及び血清反応との関係等の基礎的な事柄が、当然問題になってくる。また一方古くからツ型反応が組織親和性抗体により、ア型反応が体液親和性抗体によるとされており、この点からも本現象とツ反応との関係の吟味が必要と考えられる。著者の実験成績からは、上記のように発育抑制は毒力株感染によつて、はじめて確実となり、またツ反応陽転、沈降抗体出現に遅れてあらわれることがたしかめられた。

文献的にはこの種の報告は比較的、乏しく Waksman O'Neill¹²⁾ 等及び Heilman 等の報告があるに過ぎない。

Waksman は発育抑制現象と結核個体に認められるいわゆる“lympholysis”現象の関係を追求し、lympholysis はツ反応とは関係なく、組織培養発育抑制現象がこの皮膚感受性と関係の深いことを認め、OT 10 mg でツ反応の際に壊死を示すものに特に著しいと報告している。即ちツ反応の発赤径 10~30 mm で 3~10 mm の壊死を示し、その 10 例中 8 例には(++)~(++++)の強度の発育抑制あり、一般に強毒人型結核菌感染では、加熱人型死菌或いは結核患者喀痰感染に比して本現象は著明であり、壊死を認めぬ 3 例にも抑制が出現したといっている。また本現象は感染

21 日以後に認められる。

著者の実験例ではさらに遅れて出現し、またツ反応では壊死は認めなかつた。これは Waksman 等は海豚を使用しているので、動物の差のあること及びツ反応に使用したツ量が 2.5 mg であるためと考えられ、このツ反応に壊死を伴うかどうかということは本質的な問題になるとは考えられない。要するに強いアレルギー状態が本現象の発現に必須であることを物語るものであろう。このことは著者の本実験でも第1群において強毒野株感染により発育抑制が確実となつた点は、これを裏書きする所見と考えられる。

O'Neill 等は毛細管による組織培養法を人結核に応用しているが、ツ反応と発育抑制は必ずしも平行していないと報告している。即ちツ反応陽性の健康人では本現象陰性の例多く、ツ反応陰性健康人と殆ど差がないが、結核患者では発育抑制を認めるものが多いという。この成績も本現象の発現に強いアレルギー状態の存在が必要なることを示すものと考えられる。

Heilman 等は結核死菌感染家兎のツ反応、沈降反応及び脾の組織培養を試みて三者の関係を検討している。発育抑制は 5 羽中 4 羽に認め C.C.I. 0.74~0.25 であり、ツ反応では壊死は認められず、沈降反応と共に全例陽性に出たと報告しているが、感染後日数の関係は不明で、また沈降反応は OT 稀釈、つまり抗原稀釈のみで抗体価は不明であり著者の実験成績と比較検討する手掛かりがないのは遺憾である。

さて、本実験成績で細胞拘着性抗体の考えのもとに説明

されるツ反応と組織培養発育抑制現象が時期的に少し離れて出現すること、及びツ反応に著しい差は認められなくとも感染株毒力が本現象出現に関係することは興味ある点である。これに関する検討は第3篇に譲りたい。

結 論

本篇では第1篇に詳述した被覆硝子法による結核感染家兎白血球の組織培養を行い、ツ感受性出現の時期的関係について次の如き結論を得た。

1) 結核感染家兎培養白血球のツによる組織培養発育抑制現象は、毒力株感染では、弱力株感染に比して早期に確実に出現する。即ち、毒力人型菌感染では感染42~54日の間に本現象があらわれ、BCG感染では不確実であつた。

2) 本現象はツ反応陽転後、及び沈降反応出現後に遅れて出現する。即ち、ツ反応は各群共に14~20日までの間に陽転し、沈降反応は7~24日で陽性となつた。これに比して発育抑制現象は毒力株感染では42~54日間に出現し、またBCG感染群では58日後において本現象を認めるものがあつた。

(昭和32.2.28受付)

文 献

- 1) Waksman, B. H.: *Am. Rev. Tbc.* 68, 746 (1953).
- 2) Heilman, D. H., Feldman, W. H. & Mann, F. C.: *Am. Rev. Tbc.* 50, 344 (1944); 52, 65 (1945).
- 3) Baker, A. B.: *Am. Rev. Tbc.* 31, 54 (1935).
- 4) Clawson, B. J.: *J. Bacteriol.* 29, 32 (1935).
- 5) Higginbotham, M. W.: *Am. J. Hyg.* 26, 197 (1937).
- 6) 磯: *東京医誌* 55(4) 70 (1941).
- 7) 安在: *札幌医紀要* 2, 374 (1951).
- 8) 緒方: *血清学実験法* 145 (1947).
- 9) Aronson, J. D.: *J. Immunol.* 25, 1 (1933).
- 10) Aronson, J. D.: *J. Exp. Med.* 54, 387 (1931).
- 11) Moen, J. K. & Swift, H. F.: *J. Exp. Med.* 64, 339, 943 (1936).
- 12) O'Neill, E. F. & Favour, C. B.: *Am. Rev. Tbc.* 72, 577 (1955).